

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
1. November 2001 (01.11.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/81621 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/03301

(22) Internationales Anmeldedatum:  
23. März 2001 (23.03.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 19 553.9 20. April 2000 (20.04.2000) DE  
100 49 363.7 5. Oktober 2000 (05.10.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): ADNAGEN AG [DE/DE]; Ostpassage 7, 30853 Han-  
nover-Langenhagen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WEHMEIER, Lutz  
[DE/DE]; Auf dem grossen Kampe 26, 30900 Wedemark  
(DE). TAMAK, Cengiz [DE/DE]; Am Gehrkamp 1,  
31275 Lehrte (DE). WASCHÜTZ, Stefanie [DE/DE];  
Mühlenweg 11, 29227 Celle (DE).

(74) Anwalt: PFENNING, MEINIG & PARTNER GBR;  
Patentanwälte, Mozartstrasse 17, 80336 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,  
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,  
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD, DIAGNOSTIC KIT AND MICROARRAY FOR DETERMINING THE RHESUS FACTOR

(54) Bezeichnung: VERFAHREN, DIAGNOSE-KIT UND MIKROARRAY ZUR BESTIMMUNG DES RHESUS-FAKTORS

(57) Abstract: The invention relates to a method, a diagnostic kit, a microarray (e.g. DNA chip), and to the use thereof for deter-  
mining the rhesus factor of a human, in particular, of a human fetus for use, for example, in the field of medicine, particularly in  
the field of prenatal diagnosis. The inventive diagnostic kit contains at least one pair of oligonucleotides (reverse primers, forward  
primers), whereby both oligonucleotides of the pair are suitable for use as primers for the amplification by means of polymerase  
chain reaction of one or both complementary strands of a DNA segment of the human RhD gene.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren, ein Diagnose-Kit, ein Mikroarray (z.B. DNS-  
Chip) sowie deren Verwendung zur Bestimmung des Rhesus-Faktors eines Menschen, insbesondere eines menschlichen Fötus zur  
Verwendung beispielsweise im Bereich der Medizin, insbesondere in der Pränatal-Diagnose. Das erfindungsgemässe Diagnose-Kit  
enthält mindestens ein Paar Oligonukleotide (Reverseprimer, Forwardprimer), wobei die beiden Oligonukleotide des Paares als Pri-  
mer zur Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion jeweils eines der beiden komplementären Stränge eines DNS-Abschnittes  
des menschlichen RhD-Gens geeignet sind.

WO 01/81621 A2

Verfahren, Diagnose-Kit und Mikroarray zur Bestimmung  
des Rhesus-Faktors

5 Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Ver-  
fahren, ein Diagnose-Kit, ein Mikroarray (z.B. DNS-  
Chip) sowie deren Verwendung zur Bestimmung des Rhe-  
sus-Faktors eines Menschen, insbesondere eines  
menschlichen Fötus. Derartige Verfahren und Diagnose-  
Kits werden im Bereich der Medizin, insbesondere in  
10 der Pränatal-Diagnose, verwendet.

Ziel derartiger Pränatal-Diagnosen ist es, den Rhe-  
sus-Faktor eines Menschen, insbesondere eines Fötus,  
zuverlässig zu erfassen.

15 Der Rhesus-Faktor besitzt große klinische Bedeutung,  
insbesondere für hämolytische Krankheiten von Neuge-  
borenen, Unverträglichkeitsreaktionen bei Transfusio-  
nen und bestimmten hämolytischen Autoimmunkrankhei-  
20 ten. Die Antigene des Rhesusfaktorsystems werden auf

Polypeptiden exprimiert, die durch zwei stark homologe Gene RhD und RhCE exprimiert werden. Das RhD-Antigen legt fest, ob ein Mensch Rhesus-positiv oder Rhesus-negativ ist. Verschiedene RhD-Varianten entstehen aufgrund von Genkonversion zwischen RhD- und RhCE oder durch Mutationen in dem RhD-Gen, die einen Aminosäurenaustausch bewirken.

Nach dem Stand der Technik stehen für die Bestimmung des Rhesus-Faktors serologische Verfahren zur Verfügung.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Diagnose-Kit, ein Mikroarray, ein Verfahren sowie Verwendungen hierfür anzugeben, mit dem eine sichere und zuverlässige Bestimmung des Rhesus-Faktors eines Menschen möglich ist.

Diese Aufgabe wird durch das Diagnose-Kit nach Anspruch 1, den Mikroarray nach Anspruch 21, das Verfahren nach Anspruch 24 sowie die Verwendung nach Anspruch 42 gelöst. Vorteilhafte Weiterbildungen des erfindungsgemäßen Diagnose-Kits, des erfindungsgemäßen Verfahrens und der erfindungsgemäßen Verwendung sind in den jeweiligen abhängigen Ansprüchen gegeben.

Das erfindungsgemäße Diagnose-Kit enthält mindestens ein Paar Oligonukleotide, die als Reversprimer und Forwardprimer bei der Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion erforderlich sind. Derartige Oligonukleotid-Paare werden auch bei dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt. Die Oligonukleotide dieses Paares sind dabei so ausgesucht, daß bei Einsatz dieser Oligonukleotide in einer Polymerase-Kettenreaktion ein DNS-Abschnitt einer menschlichen DNS amplifiziert wird, der Teil der DNS des menschlichen RhD-Genes ist. Erfolgt eine Amplifikation eines DNS-Abschnittes

5 bei einer derart durchgeführten Polymerase-Kettenreaktion, so kann einfach festgestellt werden, ob ein RhD-Gen in der untersuchten DNS-Substanz vorliegt oder nicht. Folglich läßt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit feststellen, ob der Mensch Rhesus-positiv oder Rhesus-negativ ist.

10 Vorteilhaft ist es, wenn zur Amplifikation sechs Oligonukleotid-Paare eingesetzt werden bzw. in dem Kit enthalten sind, durch die bei Rhesus-positiven Individuen sechs Amplifikate gebildet werden, während in Rhesus-negativen Individuen keines der Fragmente erzeugt wird. Das erfindungsgemäße Kit und Verfahren erlaubt bei geeigneter Auswahl der Oligonukleotid-Paare weiterhin die Erfassung von Rhesus-Subtypen, die durch den Verlust eines oder mehrerer RhD-Exons zustande kommt (RhD/RhCE-Genkonversion dieser Bereiche) und sich serologisch durch eine schwächere Immunogenität auszeichnen.

20 Vorteilhafterweise werden bei den Verfahren eingesetzt bzw. enthält der Kit also mehrere Paare Oligonukleotide, die beispielsweise jeweils einen Abschnitt aus verschiedenen Exons (Kodierteilbereiche) des RhD-Gens amplifizieren. So lassen sich auch verschiedene Untergruppen des Rhesusfaktors erfassen, indem mittels einer Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion nicht nur das Vorhandensein des RhD-Gens generell festgestellt wird, sondern auch mögliche Änderungen in einzelnen Exons dieses RhD-Gens. Vorteilhafterweise weisen die Oligonukleotide eines Paares jeweils eine der folgenden Sequenzpaare auf:

35 TCGGTGCTGATCTCAGTGA und ACTGATGACCATCCTCATGT  
bzw.  
CACATGAACATGATGCACA und CAAACTGGGTATCGTTGCTG

bzw.  
GTGGATGTTCTGGCCAAGTT und CACCTTGCTGATCTTACC  
bzw.  
GTGGCTGGGCTGATCTACG und TGTCTAGTTTCTTACCGGCAAGT  
5 bzw.  
AGCTCCATCATGGGCTACAA und ATTGCCGGCTCCGACGGTATC  
bzw.  
AACAGGTTTGCTCCTAAATATT  
und  
10 AAACCTGGTCATCAAATATTTAACCT

Diese Oligonukleotidpaare führen im Falle des Vorhandenseins der entsprechenden Exons des RhD-Gens zur Amplifikation der Exons 3, 4, 5, 6, 7 bzw. des Exons  
15 9 des RhD-Gens. Zur leichteren Unterscheidung der einzelnen Amplifikationsprodukte kann jeweils ein Oligonukleotid eines Primerpaares mittels eines Fluorophors markiert sein, so daß eine Auswertung beispielsweise mittels ABI Genetic Analyzer™ der Firma  
20 PE Biosystems™ möglich ist.

Vorteilhafterweise enthält das Diagnose-Kit weiterhin die zur Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion erforderlichen Substanzen, wie sie bereits von verschiedenen Herstellern angeboten werden.  
25

Die Bestimmung des Vorhandenseins bzw. der allelischen Variabilität des RhD-Gens kann mittels eines Mikroarrays, z.B. DNA-Chips, erfolgen, wobei die einzelnen Zellen des Chips Oligonukleotide aufweisen,  
30 die spezifisch mit bestimmten Abschnitten des RhD-Gens, beispielsweise der Exons 3 bis 7 und/oder 9 hybridisieren. Zum Aufbau und der Funktion eines Oligonukleotid-Mikroarrays wird beispielhaft allgemein auf die EP 0 373 203 verwiesen. Die Bestimmung kann dabei  
35

mit oder ohne Amplifikation des gesuchten DNS-Abschnitts und ohne oder nach einem geeigneten Restriktionsverdau des gesuchten DNS-Abschnitts erfolgen.

5

Das erfindungsgemäße Verfahren, der erfindungsgemäße Nukleinsäure-Chip und insbesondere das erfindungsgemäße Diagnose-Kit besitzt den großen Vorteil, daß jeder Laborarzt und jedes medizinische Labor sowie jedes wissenschaftliche Labor, das derartige Untersuchungen durchführen möchte, die wesentlichen bzw. sämtlichen aufeinander abgestimmten Substanzen gegebenenfalls in einem einzigen Diagnose-Kit zur Verfügung erhält, so daß die aufwendigen bzw. jeglichen Vorbereitungsarbeiten für die Labore entfallen und auf einfache Weise der Rhesus-Faktor eines Menschen, insbesondere eines Fötus, bestimmt werden kann. Insbesondere sind die Primer-Oligonukleotide entwickelt und bereits ausgetestet, so daß die Hauptarbeit bei der Entwicklung entsprechender Amplifikationsprozeduren entfällt. Denn die Auswahl geeigneter Oligonukleotide, die dann in der Praxis auch tatsächlich zu dem gewünschten, sicheren Resultat führen, ist keineswegs trivial und für ein medizinisches oder wissenschaftliches Labor nicht ohne weiteres durchzuführen.

25

Mit dem vorgestellten Verfahren, dem Mikroarray und Diagnose-Kit ist es insbesondere erstmals möglich, die Bestimmung des Rhesus-Faktors eines Fötus aus dem Blut der Mutter nichtinvasiv in großem Maßstab und am jeweiligen Ort auf einfache und kostengünstige Weise durchzuführen. Denn hierzu benötigt der einzelne Laborarzt bzw. das einzelne medizinische Labor lediglich noch eine Tischzentrifuge, einen herkömmlichen Thermocycler (PCR-Gerät) sowie gegebenenfalls ein Ge-

30

35

5 rät zur Auftrennung der einzelnen DNS-Fragmente. Derartige Geräte sind jedoch in vielen medizinischen Labors bereits vorhanden. Dies kann beispielsweise eine Gelelektrophoreseeinheit oder ein Kapillarelektrophoresegerät sein.

Ein derartiges herkömmliches Kapillarelektrophoresegerät wird beispielsweise von PE Biosystems™ unter dem Namen PE ABI Genetic Analyzer 310™ vertrieben. 10 Entsprechende Thermocycler für die Amplifikation der DNS werden beispielsweise von der Firma PE Biosystems™ unter dem Namen Gene Amp 2400™ bzw. auch Gene Amp 9700™ vertrieben.

5 Erfindungsgemäß kann das Diagnose-Kit auch dahingehend weitergebildet werden, daß dem Diagnose-Kit nicht nur Oligonukleotide für die Bestimmung des Rhesus-Faktors des Fötus, wie oben beschrieben, sondern auch weitere Oligonukleotidpaare für weitere Bestimmungen beigegeben werden. Entsprechend können in weiteren Zellen des Chips entsprechende Oligonukleotide 20 angeordnet sein, die mit DNS-Abschnitten weiterer, zu erfassender Gene hybridisieren.

25 In diesem Falle ist es dem Anwender möglich, auf einfache Art und Weise nicht nur eine Bestimmung des Rhesusfaktors des Fötus, sondern zugleich auch weitere molekularbiologische Tests durchzuführen.

30 Erfindungsgemäß wird das Verfahren, der Mikroarray und das Diagnose-Kit zur Bestimmung des fötalen Rhesus-Faktors verwendet, indem zuerst eine maternale Blutprobe genommen wird. Diese maternale Blutprobe kann nun auf verschiedene Weise weiterverarbeitet 35 werden.

Zum einen werden die DNS-haltigen Bestandteile der maternalen Blutprobe anschließend aufkonzentriert. Dies erfolgt beispielsweise durch Blutsatz, gegebenenfalls unterstützt durch Anzentrifugation zur Beschleunigung der Sedimentation der zellulären Bestandteile. Durch diesen Schritt konzentriert sich die Zellfraktion in einem Blutsatz, der sich für die nachfolgende DNS-Isolierung eignet.

Der Blutsatz wird aufgenommen und eine Lyse der mütterlichen Erythrozyten sowie der nukleierten fötalen Erythrozyten durchgeführt, wodurch die DNS aus den fötalen Erythrozyten freigesetzt wird.

Anschließend erfolgt eine hochtourige Zentrifugation, beispielsweise bei 50.000 g für 30 Minuten, die zu einer Pelletierung von Zellen der Mutter und des Fötus (z.B. Lymphozyten), der aus den fötalen Erythrozyten freigesetzten DNS des Fötus sowie zellfreier DNS vom Fötus mit Herkunft aus diversen Zelltypen, führt.

Daraufhin wird das Pellet aufgenommen und es erfolgt eine Lyse der Lymphozyten sowohl mütterlicher als auch fötaler Herkunft. Nach Proteinfällung werden die Proteine abzentrifugiert. Im Überstand befindet sich dann freie DNS der Mutter und des Fötus. Diese wird mit Isopropanol gefällt und anschließend abzentrifugiert. Das Pellet enthält dann die DNS von Mutter und Fötus und wird anschließend rehydriert.

Zum anderen kann für die Gewinnung der nachzuweisenden DNS auch das Plasma/Serum der maternalen Blutprobe verwendet werden. Hierfür wird gegebenenfalls zuerst mittels Blutsatz die Zellfraktion der Mutter und des Fötus in der Blutprobe absinken lassen oder durch



anzentrifugieren abgetrennt. Der Überstand enthält dann zellfreie DNS, insbesondere zellfreie fötale DNS. Diese zellfreie DNS aus dem Plasma/Serum kann nun direkt abgetrennt werden. Bei diesem Verfahren wird der Anreicherungsschritt für die Zellen aus der ersten Variante vermieden. Denn eine Anreicherung oder Trennung der im Plasma/Serum enthaltenen DNS von Mutter und Fötus ist nicht erforderlich, da in dem Plasma/Serum etwa 800 mal mehr fötale DNS vorhanden ist als fötale DNS aus fötalen Zellen, die im mütterlichen Blut zirkulieren. Der Anteil der fötalen DNS an der gesamten im Plasma enthaltenen DNS liegt zwischen ca. 3 % und 7 %. Insgesamt nimmt dabei die zellfreie fötale DNS im Laufe der Schwangerschaft stetig zu, im letzten Trimester der Schwangerschaft sogar sehr stark.

In einem weiteren Schritt kann dann diese zellfreie fötale DNS aus dem Plasma/Serum in herkömmlicher Weise, beispielsweise mit kommerziell erhältlichem Kit, isoliert werden und ist damit für die weitere Untersuchung, z.B. durch Auftrag auf den erfindungsgemäßen Mikroarray, zugänglich.

Sowohl die DNS, die aus den fötalen nukleierten Zellen aus der maternalen Blutprobe als auch die DNS, die aus dem Serum/Plasma der maternalen Blutprobe gewonnen wurde, wird gegebenenfalls anschließend weiterverarbeitet, indem eine spezifische Amplifikation der nachzuweisenden DNS-Abschnitte in der in dem Pellet enthaltenen DNS mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) bzw. Multiplex-PCR durchgeführt wird. Hierzu werden nun das erfindungsgemäße Diagnose-Kit bzw. die darin enthaltenen Primer-Paare verwendet.

Anschließend wird die amplifizierte DNS nachgewiesen.

Dies kann einerseits mittels des erfindungsgemäßen Mikroarrays oder durch Auftrennen über Gelelektrophorese erfolgen. Sofern eines der Oligonukleotide aus einem Primer-Paar mit einem Fluorophor markiert ist, kann der Nachweis über die Detektion der entsprechenden Fluoreszenz, beispielsweise in der entsprechenden Zelle des Chips, erfolgen. Dies kann beispielsweise jedoch auch mittels eines Genetic Analyzers 310<sup>TM</sup> der Firma PE Biosystems<sup>TM</sup> erfolgen. Beide Verfahren weisen eine sehr hohe Sensitivität und Zuverlässigkeit auf.

Die erhaltenen Fluoreszenzdaten werden ausgewertet und als Nachweis für den Rhesus-Faktor des Fötus eingesetzt.

Bei dem vorliegenden Verfahren ist dabei zu beachten, daß keine Trennung der Bestandteile der maternalen Blutprobe beispielsweise in eine zelluläre oder nichtzelluläre Fraktion oder beispielsweise in eine Fraktion mit ausschließlich maternalen bzw. ausschließlich fötalen Bestandteilen durchgeführt wird. Das Verfahren ist daher sehr einfach durchzuführen.

Der Fall, bei dem sowohl die Mutter als auch der Fötus Rhesus-positiv oder die Mutter als auch der Fötus Rhesus-negativ sind, weist medizinisch keinerlei Komplikationen auf. Dasselbe gilt für den Fall, daß die Mutter Rhesus-positiv ist und der Fötus Rhesus-negativ. Auch in diesem Falle treten keinerlei medizinische Komplikationen auf.

Kritisch ist lediglich der Fall, wenn die Mutter Rhesus-negativ und der Fötus Rhesus-positiv sind. In diesem Falle ist die Gefahr gegeben, daß die Mutter gegen den Rhesus-Faktor des Fötus Antikörper bildet

und beispielsweise bei nachfolgenden Schwangerschaften und in sehr seltenen Fällen bereits in der laufenden Schwangerschaft Immunreaktionen auftreten. Genau dieser Fall kann jedoch durch das vorliegende  
5 Verfahren einfach erfaßt werden, da ein Rhesus-positiver Befund der wie oben aufgearbeiteten Blutprobe im Falle einer Rhesus-negativen Mutter, deren Rhesusfaktor in herkömmlicher Weise, spätestens zu Beginn der Schwangerschaft, serologisch bestimmt wurde,  
10 eindeutig auf einen Rhesus-positiven Fötus schließen läßt. Wird in diesem Falle beispielsweise eine Fluoreszenz erfaßt, die von einem Oligonukleotid herrührt, das zu einem Primerpaar gehört, das zur Amplifikation eines DNS-Abschnittes aus einem RhD-Gen geeignet ist, so liegt zwangsläufig bei dem Fötus ein  
15 Rhesus-positiver Befund vor, da gemäß der Annahme die mütterlichen Bestandteile selbst kein RhD-Gen aufweisen. In diesem Falle kann die herkömmliche Prophylaxe erfolgen. Im Falle einer Rhesus-negativen Mutter erfolgt bisher immer eine Prophylaxe, obwohl sie nur  
20 bei einem Rhesus-positiven Fötus erforderlich ist. Wird also mit dem erfindungsgemäßen Kit ein Rhesus-negativer Fötus festgestellt, so kann nunmehr die bisher übliche Prophylaxe bei der Mutter unterbleiben.  
25

Das erfindungsgemäße Verfahren, das erfindungsgemäße Diagnose-Kit und seine Verwendung sind also dafür geeignet, den einzig medizinisch relevanten Fall gesichert und auf einfache Weise nachzuweisen.  
30

Weiterhin ist es mit dem erfindungsgemäßen Verfahren und Kit möglich, Rhesus-Subtypen, die durch den Verlust eines oder mehrerer RhD-Exons zustande kommen  
35 (RhD/RhCE-Gen-Konversion dieser Bereiche) und sich serologisch durch eine schwächere Immunogenität aus-

zeichnen, nachzuweisen.

Im folgenden sollen einige Beispiele des erfindungs-  
gemäßen Verfahrens unter Verwendung erfindungsgemäßer  
Kits beschrieben werden.

Figur 1 zeigt die Meßergebnisse einer Rhesus-  
positiven Kontrollprobe;

Figur 2 die Ergebnisse einer Rhesus-negativen Kon-  
trollprobe

und

Figur 3 die Ergebnisse eine Multiplex-PCR.

Als Beispiel eines erfindungsgemäßen Verfahrens wurde  
einer Schwangeren eine frische Blutprobe entnommen  
und in EDTA-Puffer, beispielsweise in standardisiert,  
kommerziell verfügbaren EDTA-Röhrchen aufgenommen.  
Anschließend wurden 5 bis 10 ml des mütterlichen Blu-  
tes für 20 Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Das  
Plasma wird vorsichtig von den pelletierten Blutbe-  
standteilen getrennt und erneut für 20 Minuten bei  
3000 g zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend  
in ein neues Gefäß überführt. Die kernfreie fötale  
DNS verbleibt bei dieser Prozedur im Plasma. Die DNS  
wird dann durch die Standardprozeduren des QIAamp  
Blood Kits™ (Firma Qiagen, Hilden) isoliert und kann  
für die Bestimmung des Rhesus-Faktors mit einem Pri-  
merpaar (Single PCR) oder mit mehreren Primerpaaren  
gleichzeitig (Rhesus-Faktor-Multiplex-PCR) im folgen-  
den eingesetzt werden.

Die Anreicherung kann in einem weiteren Beispiel auch  
durch eine Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation

erfolgen.

Dieses Verfahren nutzt die Tatsache, daß bei einer konstanten Zentrifugalkraft und Mediumviskosität die Sedimentationsrate von Partikeln proportional zur Größe der Partikel ist. In dem vorliegenden Beispiel wurde Percoll™ als Zentrifugationsmedium verwendet. Es handelt sich dabei um ein Silika-Derivat, das standardmäßig zur Anreicherung bzw. Trennung von subzellulären Partikeln verwendet wird.

Zunächst wird ein kontinuierlicher Percoll-Gradient erzeugt, der einen Dichtebereich von 1,02-1,113 g/ml abdeckt. Hierzu wurden 14 ml einer Percoll-NaCl-Lösung mit einer Dichte von 1,07 g/ml bei 30 Minuten und 20.000 g zentrifugiert. Anschließend wird dieser kontinuierliche Gradient mit 10 ml mütterlichem Blut überschichtet und für 5 Minuten bei 1000 g zentrifugiert.

Nach diesem Zentrifugationsschritt finden sich die mütterlichen Thrombozyten in der Serumschicht oberhalb des Gradienten und werden mit einer Pasteurpipette entfernt und verworfen. In einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 1000 g über 5 Minuten werden die verbliebenen, unterschiedlichen Blutzellentypen entsprechend ihrer jeweiligen Dichten aufgetrennt. Die Sedimentationsschicht mit den fötalen mononuklearen Erythrozyten findet sich als Bande bei einer Dichte von 1,09 - 1,10 g/ml und kann mit einer Pasteurpipette entnommen werden. Sie wird daraufhin dreimal mit Phosphat-Puffer-Saline (PBS, pH = 7,4) gewaschen und in 1 ml PBS resuspendiert. Die DNS der mononuklearen Blutzellen wird dann durch die Standardprozeduren des QIAamp Blood Kits™ (Firma Qiagen, Hilden) isoliert und anschließend für die nachfolgen-

de Single-PCR oder Rhesus-Faktor-Multiplex-PCR eingesetzt.

5 Als ein weiteres Beispiel für eine Probenaufbereitung wird eine Blutprobe einer Schwangeren entnommen und in EDTA-Puffer, wie vorstehend ausgeführt, aufgenommen. Anschließend wird über Nacht ein Blutsatz durchgeführt. Alternativ kann die Probe auch bei geringen g-Werten anzentrifugiert werden. Von diesem Blutsatz  
10 werden 500 µl in 900 µl Erythrozyten-Lysis-Puffer des Wizzard™-Kits der Firma Promega™ aufgenommen. Daraufhin wurde in einer Sorvall™-Zentrifuge (Rotor SM 24) für 30 Minuten bei 50.000 g zentrifugiert. Hierdurch werden die vorwiegend maternalen Lymphozyten sowie  
.5 die nach der Lysis der kindlichen Erythrozyten zellfrei vorliegende DNS pelletiert. Aus dem Pellet wird nun mittels eines herkömmlichen kommerziellen DNS-Isolierungs-Kit (z.B. Wizzard-Kit™ der Firma Promega™) die DNS isoliert. Die gewonnene DNS wird in  
20 20 µl der Dehydrierungslösung gemäß den jeweiligen DNS-Isolierungs-Kit aufgenommen.

Die Isolierung fötaler kernhaltiger Erythrozyten ist weiterhin mittels FACS-Durchflußcytometrie möglich.  
25 Hierzu erfolgt zunächst eine Anreicherung aller mononuklearer Blutzellen mittels Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation (siehe oben). Die Sedimentationsschicht mit mononuklearen Blutzellen wird dabei mit einer Pasteurpipette entnommen, dreimal mit  
30 Phosphat-Puffer-Saline (PBS, pH = 7,4) gewaschen und schließlich in 1 ml PBS resuspendiert.

Im Anschluß an die Dichtegradienten-Zentrifugation werden 800 µl der erhaltenen Blutzellsuspension für  
35 60 min bei 4 °C mit einem Phycoerythrin-konjugierten monoklonalen Antikörper gegen das GlycophorinA-Ober-

flächenprotein (BD-PharMingen) und einem Fluorescein-  
Isothiocyanat (T9-FITC)-konjugierten monoklonalen An-  
tikörper gegen den Transferrin-Rezeptor (CD36) (BD-  
PharMingen) inkubiert bzw. markiert. Ein dritter  
5 Fluoreszenz Kanal wird benutzt für die negative Dis-  
kriminierung von T, B und NK Zellen. Die Endkonzentration  
beider Antikörper beträgt jeweils 0,2 µg pro  
10<sup>7</sup> Zellen. Die markierten Zellen werden zweimal PBS  
gewaschen und im Anschluß werden 10<sup>7</sup> Zellen in 1 ml  
10 PBS resuspendiert.

Für die Isolierung kernhaltiger Erythrozyten wird ein  
FACS Vantage SE-Durchflußzytometer (Becton-Dickinson)  
verwendet. Das System ist mit einem wassergekühlten  
5 dual Wellenlänge Argon-Laser (Emissionswellenlänge  
488 nm und 365 nm-UV) und ein luftgekühlter Helium-  
Neon(HeNe) Laser konfiguriert und mit fluoreszieren-  
den Beads (Becton Dickinson) kalibriert. Das Cell-  
Quest Programm wird verwendet für die Datenaufnahme,  
20 Instrumentkontrolle sowie die statistische Auswer-  
tung. Die Sortierung der Blutzellen erfolgt mit Zell-  
raten von 20.000 - 25.000 Zellen pro Sekunde, wobei  
die Zellgröße ("forward scatter"), und die Granulari-  
tät, sowie die Oberflächenstruktur ("side scatter"),  
25 die Emission der grünen Fluoreszenz (Transferin-  
Rezeptor, T9-FITC), die Emission der orangen Fluores-  
zenz (GlycophorinA, KC16-Rd) sowie die Emission der  
roten Fluoreszenz für die übrigen Parameter, wie  
CD45, CD3, CD19 und CD16/56 (APC oder Cy5 markiert),  
30 als Selektionskriterien verwendet werden. Um eine zu-  
sätzliche Diskriminierung von kernhaltigen Zellen zu  
gewährleisten wird der Kernfarbstoff Hoechst 33342  
verwendet. Die Anregung erfolgt gleichzeitig mit der  
UV-Linie des Enterprise Lasers. Die sortierten Zellen  
35 werden direkt in 1,5 ml Reaktionsgefäß, das mit 1 ml  
PBS gefüllt ist, überführt und können bei -20 °C ge-

lagert werden.

Zwar wird bei dem vorgeschlagenen Verfahren die fötale DNS nicht vollständig von der mütterlichen DNS getrennt. Sofern jedoch die Mutter Rhesus-negativ ist, weist ein positiver RhD-Nachweis jedoch immer auf einen Rhesus-positiven Fötus hin. Im Anschluß an die Isolierung der DNS wird eine Multiplex-PCR durchgeführt.

Hierzu wurden die folgenden Primer verwendet, wobei jeweils ein Primer aus einem Primerpaar mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Die entsprechenden Primer werden in der folgenden Tabelle gegeben.

Primername	Sequenz	Markierung	Größe
PRHE31F (Exon3)	5'-TCGGTGCTGATCTCAGTGGA-3'	5'-NED	108 bp
PRHE31R (Exon3)	5'-ACTGATGACCATCCTCATGT-3'	-	
PRHE41F (Exon4)	5'-CACATGAACATGATGCACA-3'	5'-HEX	120 bp
PRHE41R (Exon4)	5'-CAAACGGGTATCGTTGCTG-3'	-	
PRHE51F (Exon5)	5'-GTGGATGTTCTGGCCAAGTT-3'	5'-6-FAM	153 bp
PRHE51R (Exon5)	5'-CACCTTGCTGATCTTACC-3'	-	
PRHE61F (Exon6)	5'-GTGGCTGGGCTGATCTACG-3'	5'-NED	52 bp
PRHE61R (Exon6)	5'-TGTCTAGTTTCTTACCGCAAGT-3'	-	
PRHE71F (Exon7)	5'-AGCTCCATCATGGGCTACAA-3'	5'-6-FAM	91 bp
PRHE71R (Exon7)	5'-ATTGCCGGCTCCGACGGTATC-3'	-	
PRHE91F (Exon9)	5'-AACAGGTTTGCTCCTAAATATT-3'	5'-HEX	72 bp
PRHE91R (Exon9)	5'-AAACTTGGTCATCAAAATATTTAACCT-3'	-	

Tabelle 1



5 In der ersten Spalte der Tabelle ist dabei der Name  
des Primers angegeben. Weiterhin ist dort die Lokali-  
sierung des zu amplifizierenden DNS-Abschnittes ange-  
geben (Exon 3 bis 7, 9). In der zweiten Spalte der  
Tabelle ist die entsprechende Primersequenz angege-  
ben, in der dritten Spalte der Fluoreszenzfarbstoff,  
mit dem der jeweilige Primer markiert ist. Dabei  
10 steht die Bezeichnung 5'-NED für das Fluorophor NED<sup>TM</sup>  
der Firma PE Biosystems, die Bezeichnung 5'-HEX für  
den Farbstoff 4,7,2',4',5',7'-Hexachloro-6-  
Carboxyfluorescein und die Bezeichnung 5'-6-FAM für  
den Farbstoff Carboxyfluorescein.

15 In der letzten Spalte ist die Größe des Amplifika-  
tionsproduktes angegeben, das bei einer PCR mit dem  
jeweiligen Primerpaar entsteht. Wie zu erkennen ist,  
ergeben sich zwei verschiedene Gruppen von Amplifika-  
tionsprodukten mit Längen zwischen 52 und 91 Basen-  
20 paaren bzw. Längen zwischen 108 und 153 Basenpaaren.  
Da diese ausreichend weit voneinander entfernt lie-  
gen, kann in jeder der Gruppe einer der Farbstoffe  
wiederverwendet werden und dennoch eine zuverlässige  
25 Unterscheidung der einzelnen Amplifikationsprodukte  
erzielt werden.

Die PCR-Reaktionen wurden im vorliegenden Beispiel  
mit einem PCR-Blockcycler PE 9700 der Firma Applied  
30 Biosystems durchgeführt.

Als Reaktionsansatz wurde dabei die folgende Mischung  
verwendet, wobei als Reaktionsvolumen jeweils 100 µl  
eingesetzt wurden:

	Volumen	Endkonz.
gDNS-Template	10 µl	100 ng
Taq-Puffer	10 µl	1x
MgCl <sub>2</sub>	6 µl	1,5 mM
Nukleotide	2 µl	200 µM
Primer a	1 µl	0,12µM
Primer b	1 µl	0,12 µM
H <sub>2</sub> O	69,5 µl	
Taq-Polymerase	0,5 µl	2 U

- 5 Die PCR wurde dabei mit dem folgenden Thermozyklus durchgeführt:

94 °C	5 min
94 °C	1 min
55 °C	1 min (35 Zyklen)
72 °C	45 sec
72 °C	5 min

- 10 Zur Auswertung der PCR-Ergebnisse mittels ABI-Fragmentanalyse wurden die einzelnen PCR-Ansätze zunächst unverdünnt eingesetzt, wobei für die einzelne Analyse jeweils 1 µl verwendet wurde.

- 15 Die jeweiligen Ergebnisse sind in den Figuren 1 und 2 dargestellt. Figur 1 zeigt die Ergebnisse der PCR an einer serologisch für Rhesus-positiv bestimmten Blutprobe mit jeweils verschiedenen Primerpaaren gemäß Tabelle 1. Es ist zu erkennen, daß in den Figuren 1A bis 1F jeweils eine starke Fluoreszenz von Amplifikationsprodukten mit 108 Basenpaaren, 120 Basenpaaren, 153 Basenpaaren, 52 Basenpaaren, 91 Basenpaaren bzw. 72 Basenpaaren Länge beobachtet wurden.
- 20

Die Signale im Bereich unterhalb von 40 Basenpaaren (s. insbesondere Figur 1C) stammen vermutlich von unspezifischen Amplifikaten und beeinträchtigen das erfindungsgemäße Verfahren nicht.

Figur 2 zeigt die Ergebnisse einer PCR mit einer serologisch als Rhesus-negativ bestimmten Blutprobe mit jeweils verschiedenen Primerpaaren gemäß Tabelle 1.

Es ist unmittelbar aus den Figuren 1A bis 1F zu erkennen, daß in dieser Blutprobe keine nennenswerten Mengen von Amplifikationsprodukten mit den zu erwartenden Längen erfaßt werden konnten. Der serologische Befund wird folglich durch das erfindungsgemäße Verfahren vollständig bestätigt.

Figur 3 zeigt die Ergebnisse einer Multiplex-PCR, bei der sämtliche Primerpaare gemäß Tabelle 1 gleichzeitig eingesetzt wurden. Sämtliche PCR-Reaktionen wurden auf einem PCR-Blockcycler PE 9700 der Firma Applied Biosystems durchgeführt.

Für die PCR wurde folgender Reaktionsansatz bei einem Reaktionsvolumen von 50 µl verwendet:

	Volumen	Endkonz.
gDNS-Template	2 µl	100 ng
Taq-Puffer	5 µl	1x
MgCl <sub>2</sub>	3 µl	1,5 mM
Nukleotide	1 µl	200 µM
Primer 31F	0,25 µl	0,05 µM
Primer 31R	0,25 µl	0,05 µM
Primer 41F	0,5 µl	0,1 µM
Primer 41R	0,5 µl	0,1 µM

Primer 51F	1,5 µl	0,3 µM
Primer 51R	1,5 µl	0,3 µM
Primer 61F	0,25 µl	0,05 µM
Primer 61R	0,25 µl	0,05 µM
Primer 71F	0,5 µl	0,1 µM
Primer 71R	0,5 µl	0,1 µM
Primer 91F	1,5 µl	0,3 µM
Primer 91R	1,5 µl	0,3 µM
H <sub>2</sub> O	38,5 µl	
Taq-Polymerase	0,5 µl	2,5 U

Die PCR-Zyklen wurden mit folgenden Parametern durchgeführt:

5

95 °C	15 min
94 °C	1 min
55 °C	1 min (35 Zyklen)
72 °C	45 sec
72 °C	10 min

Die einzelnen PCR-Ansätze wurden zunächst unverdünnt eingesetzt, wobei für die Fragment-Analyse jeweils 1 µl verwendet wurde.

10

Figur 3 zeigt die Ergebnisse zweier Messungen, wobei in Figur 3A als PCR-Template zunächst Rhesus-positives Kontrollblut, wie es durch serologische Standardverfahren typisiert wurde, eingesetzt wurde. In Figur 3B sind die Ergebnisse einer PCR mit einem PCR-Template aus Rhesus-negativem Kontrollblut zu sehen. Abweichend von den vorigen Messungen wurde in beiden Fällen das Albumin-Gen als Standard hinzugefügt sowie die folgenden Primer:

15

20

Albumin fw: GCC CTC TGC TAA CAA GTC CTA C

sowie

Albumin<sub>rv</sub>: GCC CTA AAA AGA AAA TCG CCA ATC

5

Der Vorwärtsprimer ("Albumin fw") ist dabei mit dem Fluoreszenzfarbstoff 5'-Ned<sup>™</sup> markiert.

10 Hierdurch ergab sich eine Bande bei 350 Basenpaaren für die Amplifikationsprodukte des Albumin-Gens.

.5 In Figur 3A sind weiterhin die jeweiligen Signale für die Amplifikationsprodukte sämtlicher 6 Primerpaare aus Tabelle 1 zu erkennen. Offensichtlich handelte es sich also um ein Rhesus-positives Blut, das hier untersucht wurde.

20 In Figur 3B ist zu erkennen, daß in einer entsprechenden Rhesus-negativen Kontrollprobe keinerlei Fluoreszenzbanden mit Ausnahme der Albuminbande bei 350 Basenpaaren beobachtet wurde. Das erfindungsgemäße Kit, der erfindungsgemäße Mikroarray und das erfindungsgemäße Verfahren eignen sich also auch mit Multiplex-PCR zur Unterscheidung zwischen Rhesus-negativem und Rhesus-positivem Blut sowie zur Bestimmung einzelner Subtypen.

25

Patentansprüche

1. Diagnose-Kit für die Bestimmung des Rhesus-Faktors mit

5                   mindestens einem Paar Oligonukleotide (Reverse-primer, Forwardprimer),

                  wobei die beiden Oligonukleotide des Paares als  
                  Primer zur Amplifikation mittels Polymeraseket-  
0                   tenreaktion jeweils eines der beiden komplen-  
                  tären Stränge eines gesuchten DNS-Abschnittes  
                  geeignet sind, und

                  wobei der gesuchte DNS-Abschnitt Teil der DNS  
15                   des menschlichen RhD-Gens ist.

2. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch,  
                  dadurch gekennzeichnet, daß es sechs Paare Oli-  
                  gonukleotide (Reverseprimer, Forwardprimer) ent-  
20                   hält,

                  wobei die beiden Oligonukleotide der jeweiligen  
                  Paare als Primer zur Amplifikation mittels Poly-  
                  merasekettenreaktion jeweils eines der beiden  
                  komplementären Stränge verschiedener gesuchter  
25                   DNS-Abschnitte geeignet sind, und

                  wobei die gesuchten DNS-Abschnitt Teil der DNS  
                  des menschlichen RhD-Gens sind.

3. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die gesuchten DNS-Abschnitte Teil von Kodierteilbereichen des RhD-Gens sind.
- 5
4. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß je einer der gesuchten DNS-Abschnitte Teil der Kodierteilbereiche 3, 4, 5, 6, 7 oder 9 sind.
- 0
5. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es die zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion erforderlichen Substanzen enthält.
- 15
6. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es als zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion erforderliche Substanzen eine Pufferlösung, Magnesiumchlorid, Desoxynukleotid-Triphosphate, sowie eine hitzestabile Polymerase enthält.
- 20
7. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß es als hitzestabile Polymerase eine Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) enthält.
- 25
8. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es als Po-

sitivkontrolle eine DNS-Probe mit dem jeweils gesuchten DNS-Abschnitt enthält.

- 5           9.    Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden An-  
              sprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es weiter-  
              hin für eine Kontrollbestimmung einen Abschnitt  
              einer für ein Albumin kodierenden DNS sowie zwei  
              Oligonukleotide, die jeweils als Primer zur Am-  
              plifikation zumindest eines Abschnitts jeweils  
0            eines der beiden komplementären Stränge der für  
              das Albumin kodierenden DNS geeignet sind, ent-  
              hält.
- 15           10.   Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden An-  
              sprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest  
              jeweils eines der beiden Oligonukleotide eines  
              Paares von Oligonukleotiden mit Fluorophoren  
              markiert ist.
- 20           11.   Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch,  
              dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide  
              verschiedener Paare mit verschiedenen Fluoropho-  
              ren markiert sind.
- 25           12.   Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden An-  
              sprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden  
              Oligonukleotide eines Paares paarweise die fol-  
              genden Sequenzen aufweisen:



TCGGTGCTGATCTCAGTGA und ACTGATGACCATCCTCATGT  
bzw.

CACATGAACATGATGCACA und CAAACTGGGTATCGTTGCTG  
bzw.

5 GTGGATGTTCTGGCCAAGTT und CACCTTGCTGATCTTACC  
bzw.

GTGGCTGGGCTGATCTACG und TGTCTAGTTTCTTACCGGCAAGT  
bzw.

AGCTCCATCATGGGCTACAA und ATTGCCGGCTCCGACGGTATC  
10 bzw.

AACAGGTTTGCTCCTAAATATT und AACTTGGTCATCAAAA-  
TATTTAACCT

13. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch,  
15 dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide  
mit folgender Sequenz  
GTGGATGTTCTGGCCAAGTT bzw. AGCTCCATCATGGGCTACAA  
mit dem Fluorophor Carboxyfluorescein markiert  
sind.

20

14. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch,  
dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide  
mit der Sequenz  
CACATGAACATGATGCACA bzw. AACAGGTTTGCTCCTAAATATT  
25 mit dem Fluorophor 4,7,2',4',5',7'-Hexachloro-6-  
Carboxyfluorescein markiert sind.

15. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch,  
dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide  
30 mit der Sequenz

TCGGTGCTGATCTCAGTGGA bzw. GTGGCTGGGCTGATCTACG  
mit dem Fluorophor NED™ der Fa. PE Biosystems  
markiert sind.

- 5           16. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden An-  
              sprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es  
              eine Anleitung zur Durchführung der Polymer-  
              asekettenreaktion und/oder  
              eine Anleitung zur Durchführung einer Fragment-  
.0           analyse enthält.
17. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden An-  
              sprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es ein  
              Schema zur Auswertung der erhaltenen Meßergeb-  
15           nisse enthält.
18. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden An-  
              sprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es einen  
              Mikroarray (DNS-Chip) enthält, wobei der Array  
20           eine Anzahl voneinander getrennter Zellen (Fel-  
              der) aufweist und in mindestens einer Zelle des  
              Mikroarrays ein Oligonukleotid angeordnet ist,  
              das mit dem gesuchten DNS-Abschnitt hybridi-  
              siert.
- 25           19. Diagnosekit nach dem vorhergehenden Anspruch,  
              dadurch gekennzeichnet, daß in mindestens einer  
              weiteren Zelle des Mikroarrays ein weiteres Oli-  
              gonukleotid angeordnet ist und die Sequenz des  
30           Oligonukleotids, das in der mindestens einen

Zelle angeordnet ist, sich von der Sequenz des weiteren Oligonukleotides unterscheidet.

- 5           20. Diagnose-Kit nach einem der beiden vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in mindestens zwei Zellen jeweils ein Oligonukleotid angeordnet ist, wobei die in verschiedenen Zellen angeordneten Oligonukleotide jeweils mit verschiedenen gesuchten DNS-Abschnitten hybridisieren.  
.0
- 15           21. Mikroarray, beispielsweise DNS-Chip, mit einer Anordnung von mehreren, voneinander getrennten Zellen (Feldern), dadurch gekennzeichnet, daß in mindestens einer Zelle des Mikroarrays ein Oligonukleotid angeordnet ist, das mit einem DNS-Abschnitt hybridisiert, der Teil des menschlichen RhD-Gens ist.
- 20           22. Mikroarray nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß in mindestens sechs Zellen jeweils verschiedene Oligonukleotide angeordnet sind, die mit jeweils sechs verschiedenen DNS-Abschnitten des menschlichen RhD-Gens hybridisieren.  
25
23. Mikroarray nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß die DNS-Abschnitte Abschnitte

der Kodierteilbereiche (Exons) 3, 4, 5, 6, 7  
und/oder 9 sind.

- 5           24. Verfahren zur Bestimmung des Rhesusfaktors eines Menschen, dadurch gekennzeichnet, daß die alle-  
            lische Variabilität und/oder das Vorhandensein  
            des RhD-Gen in einer Blutprobe erfaßt und daraus  
            der Rhesus-Typ und/oder der Rhesus-Subtyp des  
            Menschen bestimmt wird.
- 10           25. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, da-  
            durch gekennzeichnet, daß das Vorhandensein ei-  
            nes oder mehrerer der Exons 4 bis 7 und/oder 9  
            des RhD-Gens erfaßt wird.
- 15           26. Verfahren nach Anspruch 24 oder 25, dadurch ge-  
            kennzeichnet, daß die Erfassung der allelischen  
            Variabilität und/oder des Vorhandenseins des  
            RhD-Gens mittels eines Mikroarrays nach einem  
20           der Ansprüche 18 bis 23 erfolgt.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 26,  
            dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung an  
            einer Blutprobe der Person selbst erfolgt.
- 25           28. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 oder 26,  
            dadurch gekennzeichnet, daß der Rhesusfaktor ei-  
            nes Fötus bestimmt wird, indem eine maternale  
            Blutprobe untersucht wird.

29. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß aus der maternalen Blutprobe eine Fraktion abgetrennt wird, die im wesentlichen fötale, kernhaltige Erythrozyten enthält und der Rhesus-Faktor an dieser Fraktion bestimmt wird.
30. Verfahren nach Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß die DNS-haltigen Bestandteile der maternalen Blutprobe zuerst aufkonzentriert werden und anschließend diese Fraktion untersucht wird.
31. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß zur Aufkonzentration der DNS-haltigen Bestandteile ein Blutsatz durchgeführt wird.
32. Verfahren nach Anspruch 30 oder 31, dadurch gekennzeichnet, daß zur Aufkonzentration der DNS-haltigen Bestandteile eine Lyse darin enthaltener nukleierter foetaler Erythrozyten durchgeführt und anschließend die zellfrei vorliegende DNS abzentrifugiert und für die weitere Diagnose gewonnen wird.
33. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß zur Bestimmung des Rhesus-Faktors des Fötus die zellfreie fötale DNS im Blutplasma der maternalen Blutprobe untersucht wird.

34. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 33,  
dadurch gekennzeichnet, daß aus der Blutprobe  
oder der Fraktion die DNS isoliert und zumindest  
teilweise vervielfältigt wird und anschließend  
die allelische Variabilität bzw. das Vorhanden-  
sein oder Fehlens des RhD-Gens bestimmt wird.
35. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, da-  
durch gekennzeichnet, daß die DNS durch Polyme-  
rase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt wird.
36. Verfahren nach einem der beiden vorhergehenden  
Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die ver-  
vielfältigte DNS durch geeignete Restriktionsen-  
zyme verdaut und anhand der erzeugten DNS-Bruch-  
stücke die allelische Variabilität bzw. das Vor-  
handensein und/oder Fehler des RhD-Gens bestimmt  
wird.
37. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 36,  
dadurch gekennzeichnet, daß zur Vervielfältigung  
der DNS eines oder mehrere Oligonukleotid-Paare  
verwendet werden, die die folgenden Sequenzen  
aufweisen:
- TCGGTGCTGATCTCAGTGGA und ACTGATGACCATCCTCATGT  
bzw.  
CACATGAACATGATGCACA und CAAACTGGGTATCGTTGCTG  
bzw.  
GTGGATGTTCTGGCCAAGTT und CACCTTGCTGATCTTACC

bzw.

GTGGCTGGGCTGATCTACG und TGTCTAGTTTCTTACCGGCAAGT

bzw.

AGCTCCATCATGGGCTACAA und ATTGCCGGCTCCGACGGTATC

5

bzw.

AACAGGTTTGCTCCTAAATATT und AAAGTTGGTCATCAAAA-

TATTTAACCT

0

38. Verfahren nach Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide mit der Sequenz GTGGATGTTCTGGCCAAGTT bzw. AGCTCCATCATGGGCTACAA mit dem Fluorophor Carboxyfluorescein markiert sind.

15

39. Verfahren nach Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide mit der Sequenz CACATGAACATGATGCACA bzw. AACAGGTTTGCTCCTAAATATT mit dem Fluorophor 4,7,2',4',5'7'-Hexachloro-6-Carboxyfluorescein markiert sind.

20

40. Verfahren nach Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide mit der Sequenz TCGGTGCTGATCTCAGTGGA bzw. GTGGCTGGGCTGATCTACG mit dem Fluorophor NED<sup>TM</sup> der Fa. PE Biosystems markiert sind.

25

30

41. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 bis 40, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis der amplifizierten DNS die von der amplifizierten DNS abgegebenen Fluoreszenzstrahlung erfaßt wird.

5

42. Verwendung eines Verfahrens und/oder eines Diagnose-Kits nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur pränatalen Bestimmung des Rhesus-Faktors eines menschlichen Fötuses.



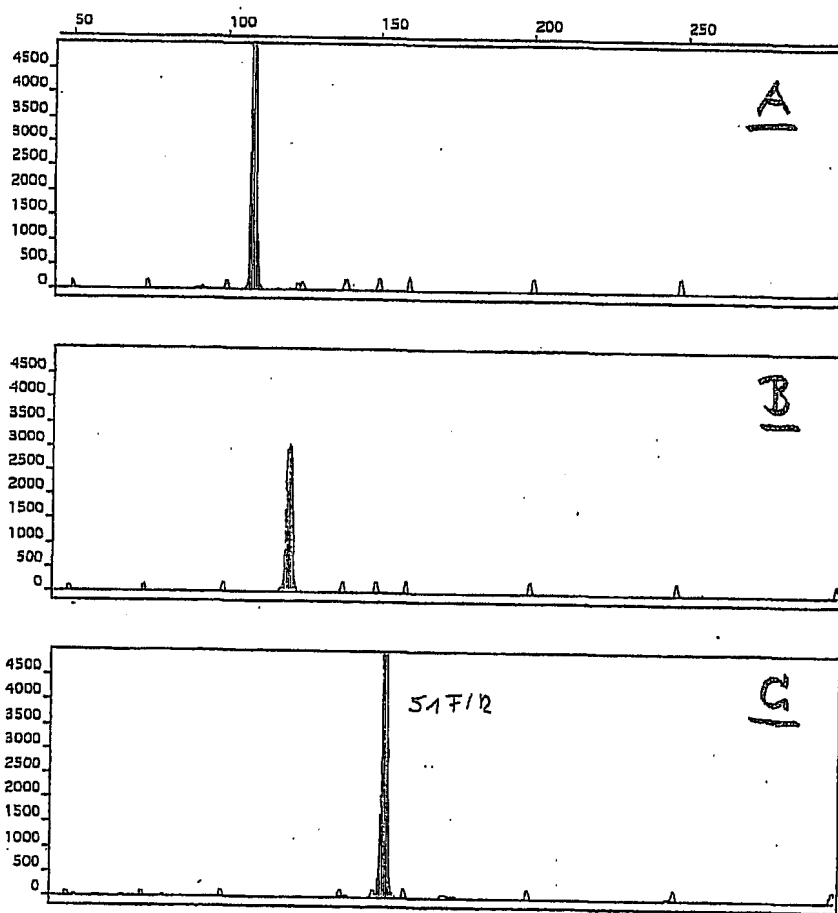


Fig. 1

2/5

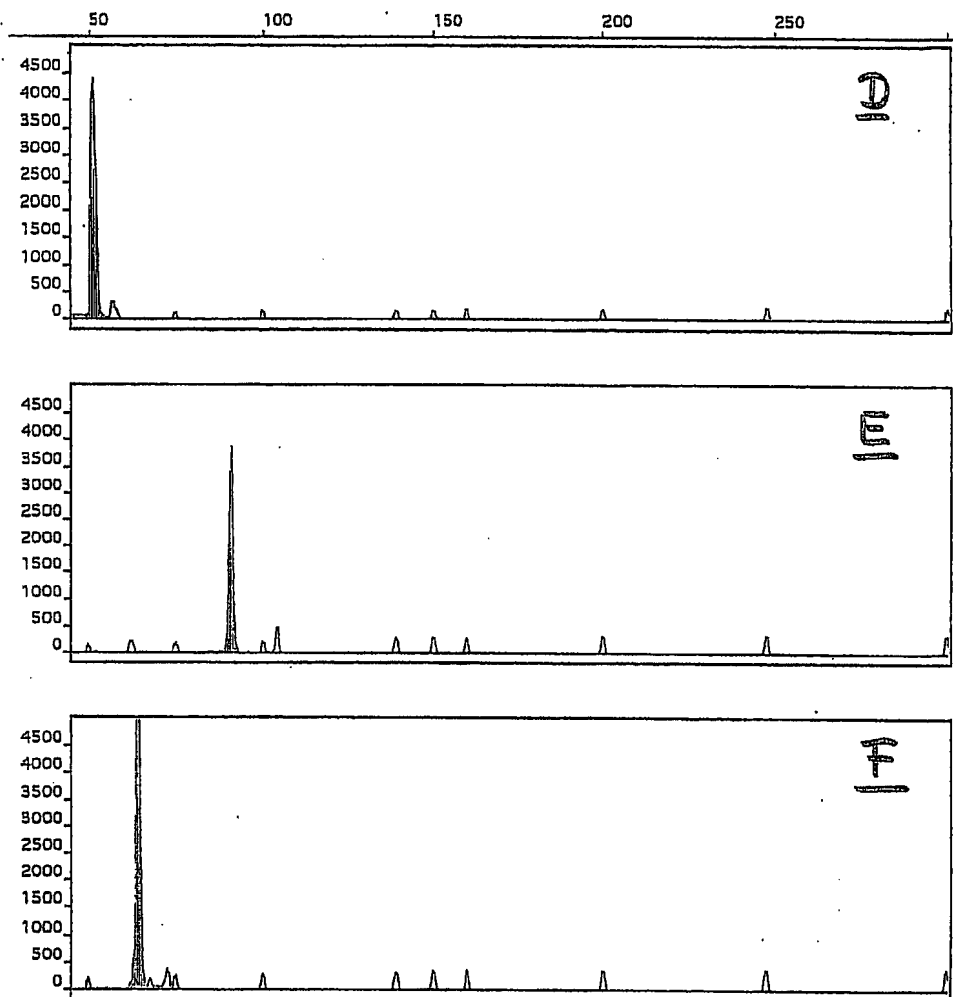


Fig. 1

3/5

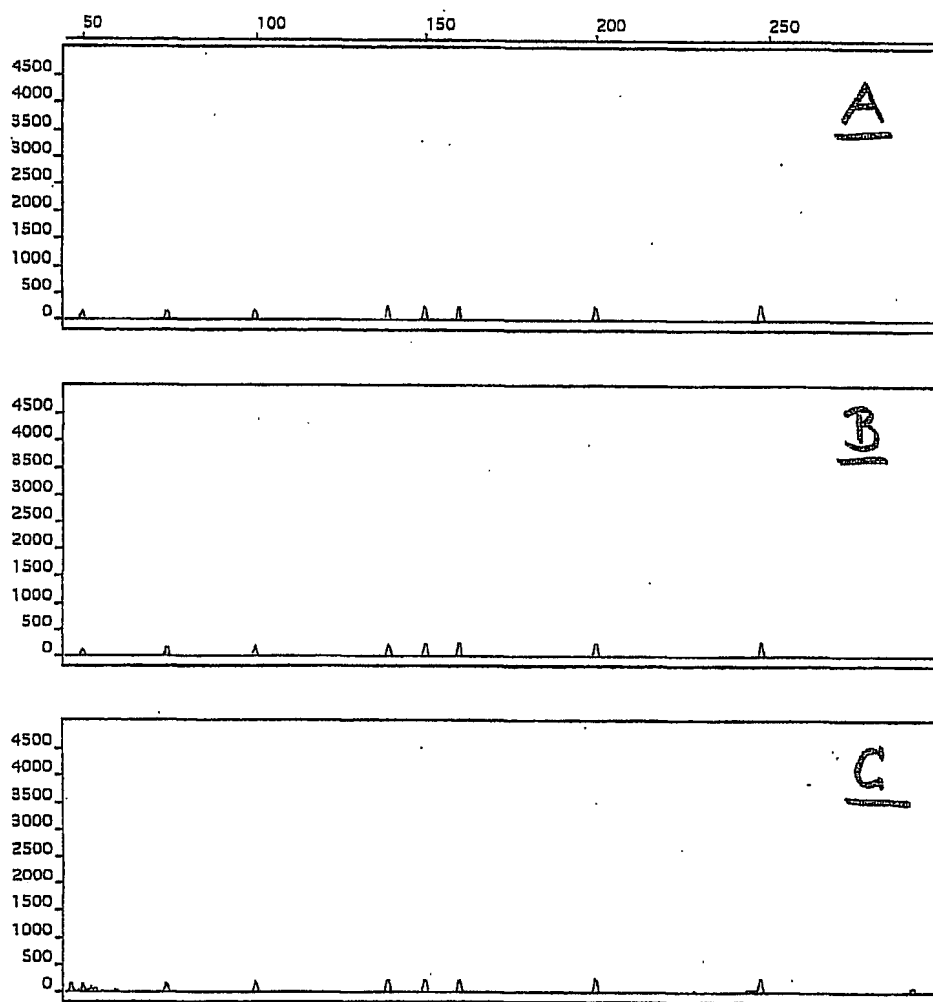


Fig. 2

4/5

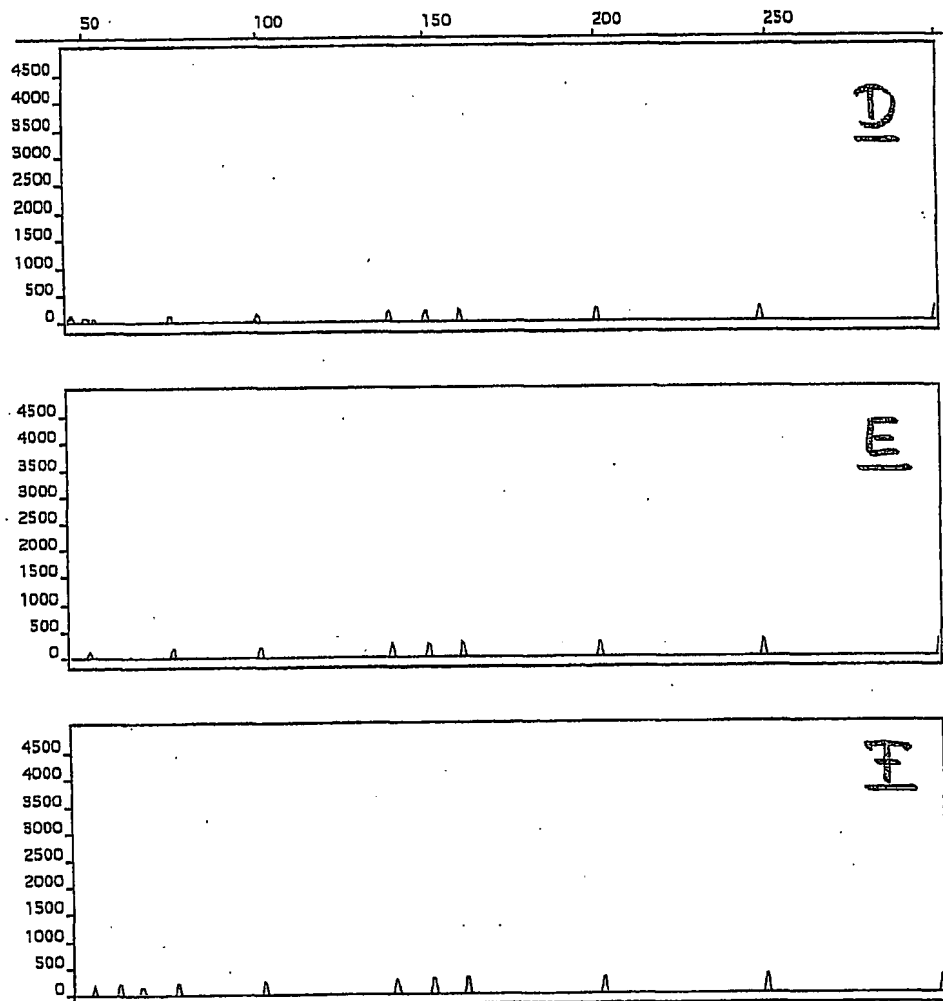


Fig. 2

5/5

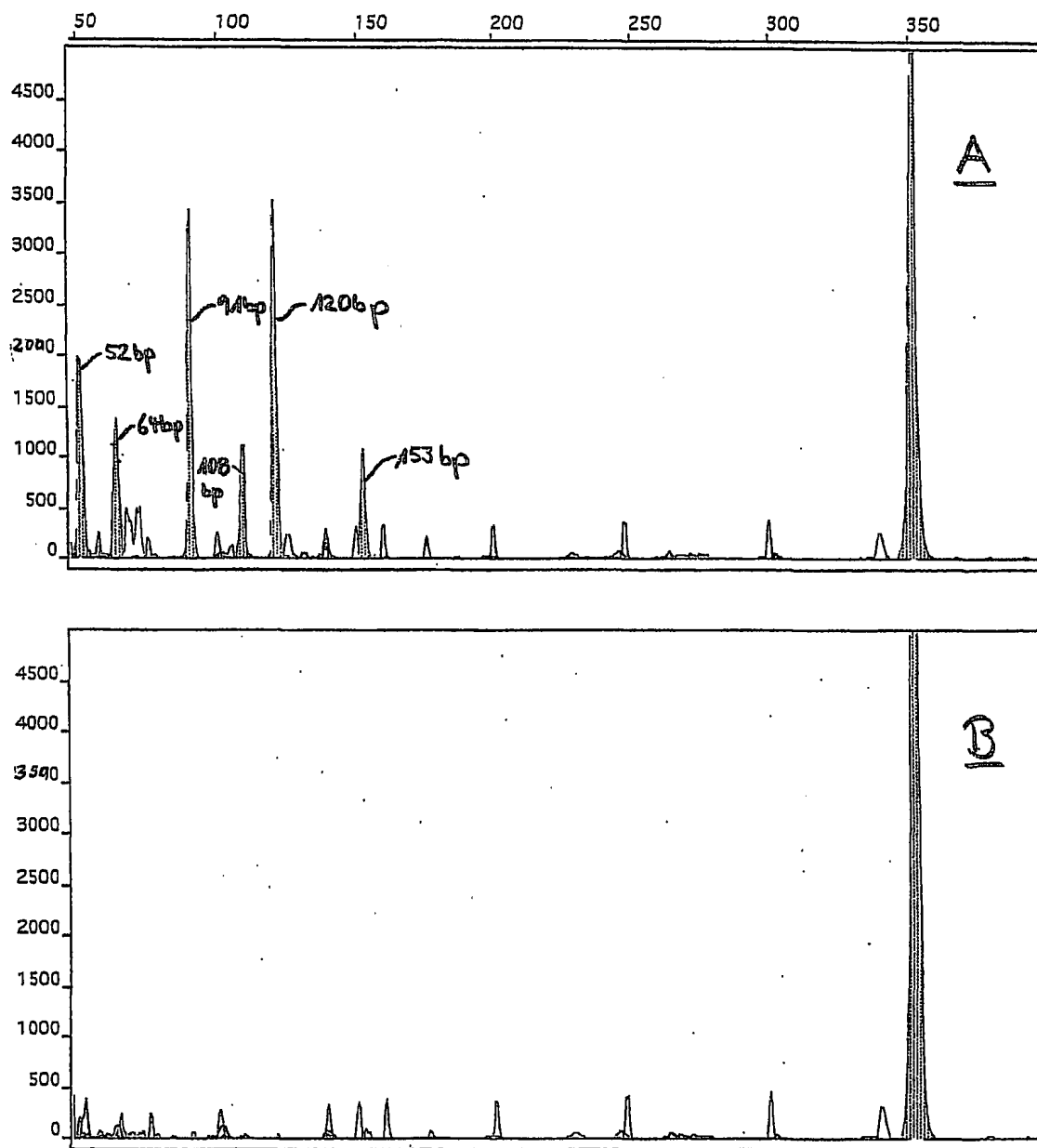


Fig. 3

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Adnagen AG

<120> Verfahren, Diagnose-Kit und Mikroarray zur Bestimmung  
des Rhesusfaktors

<130> PCT/EP

<140> PCT/EP

<141> 2001-03-20

<150> DE 10019553.9-41

<151> 2000-04-20

<150> DE 10049363.7-41

<151> 2000-10-05

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 1

tcggtgctga tctcagtgga

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 2

actgatgacc atcctcatgt

20

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 3

cacatgaaca tgatgcaca

19

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 4

caaaactgggt atcgttgctg

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 5

gtggatgttc tggccaagtt

20

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 6

caccttgctg atcttacc

18

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 7

gtggctgggc tgatctacg

19

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 8

tgtctagttt cttaccggca agt

23

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 9

agctccatca tgggctacaa

20

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 10

attgccggct ccgacggat c

21

<210> 11

<211> 22



<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 11

aacaggtttg ctcctaaata tt

22

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 12

aaacttggtc atcaaaatat ttaacct

27

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 13

gccctctgct aacaagtcct ac

22

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 14

gccctaataa gaaaatcgcc aatc

24